

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-127587

(43)Date of publication of application : 21.05.1996

(51)Int.Cl.

C07H 3/06  
A23L 1/236  
A61K 7/00  
A61K 31/70  
C08B 37/00  
C12P 19/18  
C13K 13/00

(21)Application number : 06-167486

(71)Applicant : HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC

(22)Date of filing : 28.06.1994

(72)Inventor : BANDAI TAKAHIKO  
SHIBUYA TAKASHI  
SUGIMOTO TOSHIYUKI  
MIYAKE TOSHIO

(30)Priority

Priority number : 05178623  
06 54377

Priority date : 28.06.1993  
01.03.1994

Priority country : JP  
JP

(54) NONREDUCING OLIGOSACCHARIDE, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new tasteless or low-sweetness noncrystalline, hardly crystalline or crystalline oligosaccharide, good in solubility, having a trehalose structure in the molecule and a moderate viscosity, excellent in stability and useful for foods and drinks, medicines, etc.

CONSTITUTION: A nonreducing oligosaccharide of the formula,  $\alpha$ -D- oligoglucosyl-  $\alpha$ -D- oligoglucoside. Furthermore, the nonreducing oligosaccharide comprises 4 or more kinds of glucides and preferably  $\alpha$ -D-maltosyl-  $\alpha$ -D-maltoside,  $\alpha$ -D-maltotriosyl-  $\alpha$ -D-maltoside or  $\alpha$ -D-maltotriosyl-  $\alpha$ -D-maltotrioside. This nonreducing oligosaccharide is obtained by reacting a sugar transferase (e.g. a cyclomaltodextran glucanotransferase) with an aqueous solution containing trehalose and an  $\alpha$ -glucosylglucide, etc.

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> 識別記号 F I  
C07H 3/06 C07H 3/06  
A23L 1/236 A23L 1/236 A  
A61K 7/00 A61K 7/00 F  
G  
31/702 31/702  
請求項の数19 (全19頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-167486	(73) 特許権者 000155908 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(22) 出願日 平成6年6月28日(1994.6.28)	(72) 発明者 万代 隆彦 岡山県岡山市政津1428番地
(65) 公開番号 特開平8-127587	(72) 発明者 渋谷 孝 岡山県総社市下原318番地
(43) 公開日 平成8年5月21日(1996.5.21)	(72) 発明者 杉本 利行 岡山県岡山市東畦695番44号
審査請求日 平成12年6月13日(2000.6.13)	(72) 発明者 三宅 俊雄 岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号
(31) 優先権主張番号 特願平5-178623	審査官 中木 亜希
(32) 優先日 平成5年6月28日(1993.6.28)	
(33) 優先権主張国 日本 (J P)	
(31) 優先権主張番号 特願平6-54377	
(32) 優先日 平成6年3月1日(1994.3.1)	
(33) 優先権主張国 日本 (J P)	
微生物の受託番号 FERM BP-4130	
微生物の受託番号 FERM BP-4316	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非還元性オリゴ糖とその製造方法並びに用途

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 構成糖としてのグルコースの結合様式が  $\alpha$ -結合のみからなる、一般式  $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドで表される非還元性オリゴ糖。

【請求項2】 非還元性オリゴ糖が、4糖類以上の糖質である請求項1記載の非還元性オリゴ糖。

【請求項3】 非還元性オリゴ糖が、 $\alpha$ -D-マルトシル  $\alpha$ -D-マルトシド、 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトシド又は  $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドである請求項1又は2記載の非還元性オリゴ糖。

【請求項4】  $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドが、結晶である請求項3記載の非還元性オリゴ糖。

2

【請求項5】 結晶が、粉末X線回折法における主な回折角 ( $2\theta$ ) として、 $7.8^\circ$ 、 $10.0^\circ$ 、 $13.1^\circ$ 、 $17.5^\circ$  及び  $18.2^\circ$  を有していることを特徴とする請求項4記載の非還元性オリゴ糖。

【請求項6】 トレハロースと  $\alpha$ -グルコシル糖質とを含有する水溶液若しくは末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を含有する水溶液に、糖転移酵素を作用させるか又は糖転移酵素を作用させた後加水分解酵素を作用させて、請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性オリゴ糖を生成せしめ、これを採用することを特徴とする非還元性オリゴ糖の製造方法。

【請求項7】 末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質が、還元性澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素を作用させて生成される非還元性糖質であることを特徴とする請求項6記載の非還元性オリゴ糖の製造方法。

【請求項8】 非還元性糖質生成酵素が、グルコース重合度3以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する酵素であることを特徴とする請求項7記載の非還元性オリゴ糖の製造方法。

【請求項9】 糖転移酵素が、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ又は $\alpha$ -グルコシダーゼであることを特徴とする請求項6、7又は8記載の非還元性オリゴ糖の製造方法。

【請求項10】 加水分解酵素が、 $\beta$ -アミラーゼであるか、又は $\beta$ -アミラーゼと澱粉枝切酵素であることを特徴とする請求項6、7、8又は9記載の非還元性オリゴ糖の製造方法。

【請求項11】 請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性オリゴ糖と他の糖質とを含有する糖混合溶液を強酸性カチオン交換樹脂又はオクタデシルシリカゲルを用いるクロマトグラフィーにかけ、該非還元性オリゴ糖高含有画分を採取することを特徴とする非還元性オリゴ糖の製造方法。

【請求項12】 請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる飲食物。

【請求項13】 非還元性オリゴ糖の含有量が0.1w/w%以上であることを特徴とする請求項12記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる飲食物。

【請求項14】 請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる化粧品。

【請求項15】 非還元性オリゴ糖の含有量が0.1w/w%以上であることを特徴とする請求項14記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる化粧品。

【請求項16】 請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる医薬品。

【請求項17】 非還元性オリゴ糖の含有量が0.1w/w%以上であることを特徴とする請求項16記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる医薬品。

【請求項18】 請求項1乃至5のいずれかに記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる成型物。

【請求項19】 非還元性オリゴ糖の含有量が0.1w/w%以上であることを特徴とする請求項18記載の非還元性オリゴ糖を含有してなる成型物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規糖質とその製造方法並びに用途、更に詳細には、一般式 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドで表される非還元性オリゴ糖とその製造方法並びに用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来知られている非還元性オリゴ糖は、蔗糖、エルロース、ラフィノース、メレチトース、ケストースなどのグルコースとフルクトースとが $\alpha$ -1,  $\beta$ -2結合したタイプ、すなわち分子内に蔗糖構造を含む

オリゴ糖、マルチトール、マルトリイトール、ラクチトールなどの糖アルコール、さらにグルコース同士が $\alpha$ -1,  $\alpha$ -1結合したトレハロースなどが知られている。しかしながら、分子内に蔗糖構造を含むオリゴ糖は、その蔗糖構造の安定性が悪く、特に酸性溶液中では容易に分解してしまう。そのため食品その他の加工には多くの制限を受けることとなる。また糖アルコールは高圧下で水素添加して製造されるものであり、安定性に優れているが人の体内で消化・吸収されにくく、大量摂取した場合、下痢を誘発する欠点を持っている。またトレハロースはそれ自身安定であり、本発明者等が先に、人の体内で速やかに消化・吸収されエネルギーとなることを見出ししている。しかしながら、トレハロースは分子量が比較的小さく粘性に劣り、加えて、結晶性が良過ぎるため、高濃度の水溶液として利用した場合、保存中に結晶が析出し易く、食品工業などへの利用に制限を受けることが判明した。そこで安定性に優れ、より高分子で適度な粘性を有し、消化・吸収性も良く、非結晶性乃至難結晶性又は溶解性良好な結晶性の非還元性オリゴ糖の開発が望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 分子内にトレハロース構造を有する非結晶性乃至難結晶性又は溶解性良好な結晶性の新規非還元性オリゴ糖とその製造方法並びに用途を提供する。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、新規非還元性オリゴ糖とその製造方法を確立するため、トレハロースを構成する両グルコシル基へ新たに糖を結合させることに着目し、鋭意研究してきた。その結果、トレハロースと $\alpha$ -グルコシル糖質とを含有する水溶液、又は、本発明者等が特願平4-362131号明細書（特開平7-143876号公報）で開示した末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を含有する水溶液に糖転移酵素を作用させることにより、目的を達成しうることを見だし、本発明を完成した。即ち、本発明は、トレハロースの両グルコシル基へ新たにグルコシル基がそれぞれ1乃至数個結合した一般式 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドで表される新規な非還元性オリゴ糖（本明細書では、単に「 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシド」と称することがある。）とその製造方法を確立するものであり、併せて、この新規非還元性オリゴ糖が安定性に優れ、適度な粘性を有し、非結晶性乃至難結晶性又は溶解性良好な結晶性で、無味乃至低甘味であり、経口摂取してカロリー源として利用されるなどの特性を有し、これらの特性を利用してその用途を確立するものである。

【0005】 本発明の非還元性オリゴ糖は、化学的に合成することも可能であるが、工業的には、生化学反応、とりわけ、トレハロースと $\alpha$ -グルコシル糖質とを含有

する水溶液、又は末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を含有する水溶液に糖転移酵素を作用させることにより生成させるのが有利である。トレハロースとしては、その含量ができるだけ高いものが適しており、一般的には、固形物当たり5w/w%以上（以下、本明細書に於いては特にことわらないかぎり、w/w%を%で示す。）の糖質、望ましくは、20%以上の糖質、更に好ましくは、50%以上の高含有糖質が好適である。その製造方法としては、還元性を示す澱粉部分分解物（本明細書では、還元性澱粉部分分解物と呼ぶこともある。）から酵素的に調製する方法、例えば、本発明者等が、特願平4-362131号明細書（特開平7-143876号公報）、特願平5-156338号明細書（特開平7-213283号公報）、特願平5-199971号明細書（特開平7-170977号公報）などで開示した澱粉部分分解物から酵素反応により製造する方法が容易に大量生産できるので、工業的生産方法としてきわめて有利である。必要ならば、市販の高純度トレハロースを用いることも随意である。

【0006】 $\alpha$ -グルコシル糖質としては、例えば、澱粉、糊化澱粉、液化澱粉、可溶性澱粉、アミロース、アミロペクチン、還元性澱粉部分分解物、澱粉糖転移物、シクロデキストリン、デキストリン、マルトオリゴ糖、蔗糖などの $\alpha$ -グルコシド結合を有する糖質が適宜使用される。

【0007】末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質としては、本発明者等が、特願平4-362131号明細書（特開平7-143876号公報）で開示したように、還元性澱粉部分分解物に重合度3以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する酵素（本明細書では、「非還元性糖質生成酵素」と略称することがある。）を作用させて生成されるものが有利に利用できる。本発明に用いる非還元性糖質生成酵素としては、例えば、本発明者等が、先に、特願平5-349216号明細書（特開平7-143876号公報）で記載したように、既に、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託しているリゾビウム・スピーシーズ（*Rhizobium* sp.）M-11『受託番号、微工研条寄第4130号（FERM BP-4130）』やアルスロバクター・スピーシーズ（*Arthrobacter* sp.）Q36『受託番号、FERM BP-4316』などの微生物、更には、公知の、例えば、ブレビバクテリウム・ヘロボルム（*Brevibacterium helvolum*）ATCC11822、フラボバクテリウム・アクアティレ（*Flavobacterium aquatile*）IFO3772、ミクロコッカス・ルテウス（*Micrococcus luteus*）IFO3064、ミクロコッカス・ロゼウス（*Micrococcus roseus*）ATCC186、

クルトバクテリウム・シトレウム（*Curtobacterium citreum*）IFO15231、マイコバクテリウム・スメグマチス（*Mycobacterium smegmatis*）ATCC19420、テラバクター・ツメスセンス（*Terrabacterium tumescens*）IFO12960などの非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を栄養培地に培養し、この培養物を採取し利用することもできるが、必要ならば、公知の方法で適宜精製して利用してもよい。このようにして得られる非還元性糖質生成酵素は、グルコース重合度3以上から選ばれる1種又は2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有する。

【0008】末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を製造するには、通常、澱粉、糊化澱粉、液化澱粉、溶性澱粉、アミロース、アミロペクチン、デキストリンなどの $\alpha$ -グルコシル糖質に、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ又は $\alpha$ -アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させて得られる還元性澱粉部分分解物に、前述の方法で調製される非還元性糖質生成酵素を作用させて製造するのが好都合である。

【0009】糖転移酵素としては、例えば、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（EC 2. 4. 1. 19）の使用が望ましいが、必要に応じて $\alpha$ -アミラーゼ（EC 3. 2. 1. 1）、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（EC 3. 2. 1. 20）なども使用できる。シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを使用する場合には、公知のバチルス（*Bacillus*）属、クレブシーラ（*Klebsiella*）属などに属する微生物由来の酵素が適宜使用できる。 $\alpha$ -アミラーゼとしては、例えば、バチルス属に属する微生物由来の酵素、とりわけ糖化型 $\alpha$ -アミラーゼが使用される。 $\alpha$ -グルコシダーゼとしては、例えば、公知のペニシリウム（*Penicillium*）属、ムコール（*Mucor*）属などに属する微生物又はこれら微生物由来の酵素又はイネ種子、小麦種子などの植物由来の酵素が使用される。

【0010】糖転移反応は、本発明の非還元性オリゴ糖が生成する方法であればよく、使用する酵素によって適宜選ばれる。例えば、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ又は $\alpha$ -アミラーゼを使用する場合には、トレハロースと液化澱粉、還元性澱粉部分分解物などの $\alpha$ -グルコシル糖質とを含有する水溶液に作用させて、トレハロースの両グルコシル基へ $\alpha$ -グルコシル糖質から $\alpha$ -グルコシル基を1個又は2個以上転移し、本発明の非還元性オリゴ糖を生成させればよい。この際、トレハロースに対する $\alpha$ -グルコシル糖質の重量比は、通常、0.1乃至100倍、望ましくは、0.2乃至20倍が好適である。また、末端にトレハロース構

造を有する非還元性糖質にシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを作用させて $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドを生成することにも有利に実施できる。 $\alpha$ -グルコシダーゼを使用する場合には、トレハロースと $\alpha$ -グルコシル糖質、例えばデキストリン、マルトオリゴ糖、蔗糖などの比較的低分子量の $\alpha$ -グルコシル糖質とを含有する水溶液に作用させて、トレハロースの両グルコシル基へ $\alpha$ -グルコシル糖質から $\alpha$ -グルコシル基を転移し、本発明の非還元性オリゴ糖を生成させればよい。この際、トレハロースに対する $\alpha$ -グルコシル糖質の重量比は、通常、0.1乃至100倍、望ましくは、0.2乃至20倍が好適である。

【0011】これら酵素反応は、通常、温度20乃至80℃、pH3乃至9から選ばれる条件で反応させればよく、更に酵素又はこれを含む微生物を、例えば、担体結合法、架橋法、包括法などの公知方法により固定化して連続反応させることも回分反応で繰り返し利用することも随意である。また、これら糖転移反応のうち、より安価な $\alpha$ -グルコシル糖質を糖供与体にし得ること、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル $\alpha$ -D-オリゴグルコシドの生成率が高いことなどから、一般的には、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼの使用が好都合であり、とりわけ、より高温で作用させることのできるバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来の酵素が、反応液中の $\alpha$ -グルコシル糖質の老化を抑制し、微生物の汚染を抑制でき、反応を容易に進めることができるので工業的に極めて有利である。この場合には、通常、トレハロースと、例えば糊化澱粉、液化澱粉、DE1乃至50程度の還元性澱粉部分分解物、アミロデキストリン、シクロデキストリンなどの $\alpha$ -グルコシル糖質とを含有する水溶液又は末端にトレハロース構造を有する非還元性オリゴ糖を含有する水溶液にシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを $\alpha$ -グルコシル糖質g当たり0.1単位以上、望ましくは、1乃至25単位程度を1乃至100時間、望ましくは、4乃至70時間程度作用させると、トレハロースの両グルコシル基へ $\alpha$ -グルコシル基がそれぞれ1乃至数個結合した非還元性オリゴ糖、例えばマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド、マルトトリオシルマルトトリオシド、マルトテトラオシルマルトトリオシド、マルトテトラオシルマルトテトラオシド、マルトペンタオシルマルトテトラオシド、マルトペンタオシルマルトペンタオシドなどの $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシド ( $G_m-T-G_n$ ; 但し、Gはグルコース残基を意味し、m、nは1乃至8から選ばれる整数を意味し、Tは $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを意味する。) が生成し、これを採取すれば良い。必要ならば、更に、これに加水分解酵素、望ましくは、 $\beta$ -アミラーゼ (EC

3. 2. 1. 2)、又は $\beta$ -アミラーゼとともにブルナーゼ、イソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素を作用させると、非還元性糖質として主としてマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドが蓄積されることとなり、このマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドを採取することもできる。

【0012】以上述べたような、糖転移反応、又は糖転移反応と加水分解反応によって生成される4糖類以上の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシド含有溶液は、通常、固形物当たり、それを5乃至60%程度含有しており、これを濾過、精製して液状で利用することも、また、濃縮してシラップ状で利用することも、更に、噴霧乾燥、真空乾燥などで乾燥して固状で利用することも随意である。

【0013】一般的には、比較的低分子の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドの特徴を生かすため、糖転移反応後、加水分解して得られる4糖類、5糖類及び6糖類含有水溶液を利用するか、更に分離、精製して、4糖類、5糖類及び6糖類高含有物にして利用される。その方法としては、例えば、酵母醗酵法、膜濾過法、分別沈澱法、アルカリ処理法、カラムクロマトグラフィーなどにより夾雑糖類を分離除去する方法が適宜採用できる。とりわけ、特開昭58-23799号公報、特開昭59-148794号公報などに開示されている塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、夾雑糖類を除去して、例えば、4糖類及び5糖類非還元性オリゴ糖高含有画分、又は4糖類、5糖類及び6糖類非還元性オリゴ糖高含有画分を採取する方法が有利に実施できる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。また必要ならば、これら4糖類、5糖類又は6糖類をそれぞれに分離して採取することも随意である。

【0014】本発明の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドは、非還元性オリゴ糖で極めて安定であり、また、無味又は低甘味であり、適度な粘性を有し、非結晶性乃至難結晶性又は溶解性良好な結晶性である。また経口摂取により消化酵素の作用を受け、体内で吸収されるのでカロリー源としても有効である。更に、虫歯誘発菌などによって、醗酵されにくいことより、虫歯を起しにくい低甘味糖質材料としても利用できる。また、化学的に安定であり、糖類と褐変反応を起し易いアミノ酸、オリゴペプチドなどと共用できる。更に、活性の失われやすい生理活性物質などを安定化し得ると共に、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、他の糖の晶出防止性、難醗酵性、澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【0015】 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリ

ゴグルコシドの持つこれら諸性質は、食品、嗜好物、飼料、餌料などの飲食物、更には、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物の製造に有利に利用できる。本発明の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル $\alpha$ -D-オリゴグルコシドの比較的低分子のものは、甘味度が低いものの、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メープルシュガー、ソルビトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、 $\alpha$ -アスパルチル- $\alpha$ -フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種又は2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【0016】また、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル $\alpha$ -D-オリゴグルコシド粉末品は、実質的に難吸湿性の粉末で、耐熱性が大きく、安定性も良いので、増量剤、賦形剤、粉末基剤などとして、そのまま、又は必要に応じて、他の増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成形して使用することも随意である。また、本粉末品は、小麦粉、コーングリッツ、澱粉などの粉類の一部又は全量に置き換えて、例えば、製菓材料、製パン材料などに利用することも有利に実施できる。

【0017】また、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル $\alpha$ -D-オリゴグルコシドの呈味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレーウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガー、など各種調味料として有利に使用できる。さらに、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンデーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の

素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢コンブ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などのそう菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、合成酒、洋酒などの酒類、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0018】また、家畜、家禽、その他蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服薬、トローチ、錠剤、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい薬など各種固形状、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの口中使用物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、更には品質改良剤として有利に利用できる。

【0019】また、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル $\alpha$ -D-オリゴグルコシドは、例えば、石鹸、スキンクリーム、ボディシャンプー、ヘアクリーム、リップクリーム、美肌剤、育毛剤などへの安定剤、浸透圧調節剤、賦形剤、保湿調節剤、粘度調節剤、品質改良剤などとして化粧品製造に有利に利用できる。

【0020】更に、生理活性物質、例えば、インターフェロン $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、 $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファー・ファクター、インターロイキン2などのサイトカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風菌トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどのワクチン、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、 $\alpha$ -アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、グルカナーゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、プロポリス、ローヤルゼリーなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、ビフィズス菌、酵母などの生菌類などの有効成分、活性の安定剤として、更には、浸透圧調節剤、賦形剤、経管栄養剤、シロップ剤などとして医薬品製造に有利に利用できる。以上述べたような飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に



本発明の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドを含有せしめる方法は、その組成物が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その含有せしめる量は、組成物によっても異なるが、一般的には、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドとして、0.1%以上、望ましくは0.5%以上の量が好適である。このようにして得られる組成物は、経口的又は非経口的に利用される飲食物、化粧品、医薬品のみならず、それ以外にも、例えば、生活用品、農林水産用品、化学工業用品など広範な用途を有する。

【0021】次に、実験により本発明を更に詳細に説明する。

【0022】まず、実験Aで、非還元性糖質生成酵素の一例として、リゾビウム・スピーシーズ M-11からの酵素の生産、精製及び性質について説明し、その後、該酵素を用いた還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質及びトレハロースの調製例について説明する。次に、実験Bで、本発明の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドの調製例とその理化学的性質について述べる。

【0023】

【実験A-1 リゾビウム・スピーシーズ M-11からの非還元性糖質生成酵素の生産】マルトース2.0w/v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二ナトリウム0.1w/v%、リン酸一カリウム0.1w/v%及び水からなる液体培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120℃で20分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) を接種し、27℃、130rpmで24時間培養したものを種培養液とした。

【0024】容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地約20lを入れて滅菌、冷却して温度30℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度30℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、約24時間通気攪拌培養した。培養液の本酵素活性は約1.5単位/mlであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で元の培養液と同じ液量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には約0.6単位/mlの酵素活性が、また、培養液上清には約0.9単位/mlの酵素活性が認められた。

【0025】非還元性糖質精製酵素の活性測定方法は、基質としてマルトペンタオース1.25w/v% (50mMリン酸緩衝液、pH7.0) 4mlに酵素液を1ml加え40℃で60分間反応させた後、100℃で10分間加熱して反応を停止させ、その反応液を正確に脱イオン水で10倍に希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ100℃で10分間加熱させることにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1分間に1 $\mu$ molのマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を1単位と定義した。

【0026】

【実験A-2 酵素の精製】実験A-1で得られた培養液約18lを超高圧菌体破碎装置ミニラボ (大日本製薬株式会社製) で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離 (10,000rpm, 30分間) することにより、約16lの上清を得た。その液に飽和度0.2になるように硫酸を溶解させ、4℃、1時間放置した後、遠心分離 (10,000rpm, 30分間) することにより上清を回収した。

【0027】更に、その液に飽和度0.6になるように硫酸を溶解させ、4℃、24時間放置した後、遠心分離 (10,000rpm, 30分間) して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離 (10,000rpm, 30分間) して不溶物を除いた。その透析液 (360ml) を2回に分けて、DEAE-トヨパールゲル (東ソー株式会社製造) を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル量300ml) を行った。

【0028】本酵素はDEAE-トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。得られる酵素活性画分を、2M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離 (10,000rpm, 30分間) して不溶物を除き、得られる上清をブチルトヨパール650ゲル (東ソー株式会社製造) を用いた疎水カラムクロマトグラフィー (ゲル量300ml) を行った。吸着した本酵素を硫酸2Mから0Mのリニアグラジエントによりカラムから溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、トヨパールHW-55樹脂 (東ソー株式会社製造) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (ゲル量300ml) を行い、酵素活性画分を回収した。精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を表1に示す。

【0029】

【表1】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白質)	収率 (%)
培養液	26,800		100
破砕後の上清	20,300	0.10	76
硫酸塩析後の透析液	16,100	0.32	60
イオン交換カラム溶出液	11,300	5.5	42
疎水カラム溶出液	5,730	98	21
ゲル濾過溶出液	3,890	195	15

【0030】表1の工程でゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度7.5w/v%)を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

#### 【0031】

【実験A-3 酵素の性質】実験A-2で得られた精製酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲル濃度10w/v%)を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した標準分子量マーカー(日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約77,000乃至87,000ダルトンであった。

【0032】精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル(2w/v%アンフォライン含有、スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)を用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.6乃至4.6であった。

【0033】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響は活性測定方法に準じて調べた。結果を図1(温度の影響)、図2(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、60分間反応で、40℃付近、至適pHは、40℃、60分間反応で、約7.0であった。本

酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図3(温度安定性)、図4(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は40℃付近まで安定であり、pH安定性は約6乃至9であった。

#### 【0034】

【実験A-4 非還元性糖質の調製】基質として、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、又はマルトヘプタオースの20%水溶液を調製し、それぞれに実験A-2で得られた精製酵素を基質固形物グラム当たり2単位の割合で加え、40℃、pH7.0で48時間作用させた後、脱塩し、ワコーピーズ WB-T-330カラム(和光純薬工業株式会社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。高速液体クロマトグラフィーは、室温下で行い、溶離液として水を流速0.5ml/分で流し、示差屈折計RI-8012(東ソー株式会社製造)で分析した。その結果を表2に示す。

#### 【0035】

#### 【表2】



基質	反応物	HPLC 溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコース	グルコース	33.4	100.0
マルトース	マルトース	28.5	100.0
マルトトリオース	PI	23.3	35.0
	マルトトリオース	25.9	65.0
マルトテトラオース	PII	21.6	85.6
	マルトテトラオース	24.1	14.4
マルトペンタオース	PIII	19.7	92.7
	マルトペンタオース	22.6	7.3
マルトヘキサオース	PIV	18.7	93.5
	マルトヘキサオース	21.4	6.5
マルトヘプタオース	PV	17.8	93.4
	マルトヘプタオース	21.0	6.6

(注) 表中、PI、PII、PIII、PIV、PVは、それぞれの基質、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースから新たに生成した糖質を意味する。

【0036】表2の結果から明らかなように、反応物中には残存するそれぞれの基質と新たに生成したそれぞれの糖質PI、PII、PIII、PIV、PVからなり、それ以外の糖質はほとんど検出されない。それぞれの生成率はグルコース重合度3のPIが比較的低いものの、グルコース重合度4以上のPII、PIII、PIV、PVは85%以上の高い生成率であることが判明した。なお、グルコース、マルトースからは、新たな糖質を生成しないことが判明した。

【0037】それぞれの反応物から新たに生成した糖質を精製するため、脱色、脱塩、濃縮後、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂(XT-1016、Na<sup>+</sup>型、架橋度4%、東京有機化学工業株式会社製造)を用いたカラム分画を行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付きステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、新たに生成した糖質含量97%以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を真空乾燥し、それぞれ高純度糖質標品を調製した。基質原料に対する収率は、固形物換算で、それぞれPIで約9%、PIIで約65%、PIIIで約82%、PIVで約80%、PVで約77%であった。その純度は、それぞれPIで97.5%、PIIで98.6%、PIIIで99.5%、PIVで98.4%、PVで98.4%であった。

【0038】またこれらの新たに生成した高純度糖質標品の還元力をソモギー・ネルソン法で測定し、DEで表した。結果は表3にまとめた。

【0039】

【表3】

糖質標品	純度 (%)	DE
PI	97.5	0.83
PII	98.6	0.35
PIII	99.5	0.10
PIV	98.4	0.27
PV	98.4	0.23

【0040】表3の結果から明らかなように、いずれの標品にも僅かな還元力しか認められなかった。その僅かな還元力は、その標品中に微量に混入、残存している基質由来の還元性マルトオリゴ糖に起因するものと推定され、新たに生成した糖質はいずれも実質的に非還元性であると判断される。

【0041】

【実験A-5 グルコアミラーゼによる酵素分解】実験A-4において調製した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV又は、PVのそれぞれ50mgを、50mM酢酸緩衝液(pH4.5)1mlに溶解

し、1単位のグルコアミラーゼ（生化学工業株式会社製造）を加え、40℃で6時間保ち、酵素分解した後、高速液体クロマトグラフィーで分解物を分析したところ、いずれの標品からも分解物としてグルコースとトレハロースのみが検出された。検出されたグルコース含量、トレハロース含量、その組成モル比の結果を表4に示す。

【0042】

【表4】

糖質標品	グルコース (%)	トレハロース (%)	組成モル比 (グルコース/トレハロース)
PI	36.2	63.8	1.07
PII	52.0	48.0	2.08
PIII	61.4	38.6	3.02
PIV	68.3	31.7	4.09
PV	72.9	27.1	5.11

【0043】表4の結果から明らかなように、グルコアミラーゼにより、非還元性糖質PIはグルコース1分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIIはグルコース2分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIIIはグルコース3分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PIVはグルコース4分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質PVはグルコース5分子とトレハロース1分子に分解されることが判明した。

【0044】また、グルコアミラーゼの反応特性を考慮すると、これら非還元性糖質の構造はトレハロース分子にグルコース分子が $\alpha$ -1, 4結合、もしくは $\alpha$ -1, 6結合で結合した糖質で、それぞれ、PIはトレハロース1分子にグルコース1分子が結合したグルコース重合度3の非還元性糖質で、PIIはトレハロース1分子にグルコース2分子が結合したグルコース重合度4の非還元性糖質で、PIIIはトレハロース1分子にグルコース3分子が結合したグルコース重合度5の非還元性糖質で、PIVはトレハロース1分子にグルコース4分子が結合したグルコース重合度6の非還元性糖質で、PVはトレハロース1分子にグルコース5分子が結合したグルコース重合度7の非還元性糖質であると判断される。なお、同様に、非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、又はPVに $\beta$ -アミラーゼを作用させたところ、非還元性糖質PI、PIIは分解されず、PIIIはマルトースの1分子とPIの1分子に分解され、PIVはマルトースの1分子とPIIの1分子に分解され、PVはマルトースの2分子とPIの1分子に分解されることが判明した。

【0045】以上の結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素による反応は、基質の低分子化及び高分子化を伴わない、換言すれば、グルコース重合度の変化を伴わない、分子内変換反応と判断され、また、この非還元性糖質生成酵素によって生成した非還元性糖質、PI、PII、PIII、PIV及びPVは、それぞれ、 $\alpha$ -グリコシルトレハロース（別名、 $\alpha$ -マルトシルグルコシ

ド）、 $\alpha$ -マルトシルトレハロース（別名、 $\alpha$ -マルトリオシルグルコシド）、 $\alpha$ -マルトリオシルトレハロース（別名、 $\alpha$ -マルトテトラオシルグルコシド）、 $\alpha$ -マルトテトラオシルトレハロース（別名、 $\alpha$ -マルトペンタオシルグルコシド）及び $\alpha$ -マルトペンタオシルトレハロース（別名、 $\alpha$ -マルトヘキサオシルグルコシド）で示される $\alpha$ -グリコシルトレハロース（G-T：但し、Gはグルコース残基を意味し、nは1以上の整数を意味し、Tは $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースを意味する。）であると判断される。

【0046】

【実験A-6 末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質とトレハロースの調製】澱粉部分分解物（松谷化学工業株式会社製造、商品名バインデックス#4）40重量部を水60重量部に加熱溶解し、この溶液を45℃、pH6.5に調整した後、実験A-2の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を還元性澱粉部分分解物g当たり1単位の割合になるように加えて96時間反応させ、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成させ、次いで100℃で10分間加熱して、酵素を失活させた。本反応液を濃度約20%まで希釈し、グルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名グルコチーム）を澱粉部分分解物g当たり10単位加えて40時間反応させ、次いで加熱して、酵素を失活させた。本溶液を、常法にしたがって、活性炭にて脱色し、イオン交換樹脂にて脱塩し、濃度約60%に濃縮した。本糖液中には固形物当たり29.5%のトレハロースを含有していた。この濃縮液を塩型強酸性カチオン交換樹脂（オルガノ株式会社販売、商品名CG6000、Na型）が充填されたジャケット付きステンレス製カラムに、60℃、SV0.4でチャージし、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有液は、固形物当たり約90%のトレハロースを含有していた。本溶液を濃度約75%に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶としてトレハロース含水結晶を約2%加えて徐冷し、晶出率約45%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥塔上のノズル

より150 kg/cm<sup>2</sup>の高圧にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥塔の上部より送風し、底部に設けた移送金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を得た。

【0047】

【実験B-1 α-D-オリゴグルコシル α-D-オリゴグルコシドの調製】実験A-6の方法で調製したトレハロース50重量部及び還元性澱粉部分分解物(DE 8、松谷化学工業株式会社製造、商品名パインデックス#1)50重量部を水150重量部に加熱溶解し、この溶液を温度60℃、pH6.0にして、バチルス・ステアロサーモフィラス由来のシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を還元性澱粉部分分解物g当たり10単位加えて40時間反応させ、次いで100℃で30分間加熱して、酵素を失活させた。この溶液を温度55℃、pH5.0にして、β-アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社販売、商品名β-アミラーゼ#1500)を還元性澱粉部分分解物g当たり20単位加えて16時間反応させ、次いで100℃で15分間加熱して酵素を失活させた。本溶液には、本発明のα-D-オリゴグルコシル α-D-オリゴグルコシドとして物質1、物質2及び物質3をそれぞれ固形物当たり約15%、約15%及び約4%含有していた。本溶液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂(H型及びOH型)にて脱塩し、濃度約45%に濃縮して、カラムクロマトグラフィーを行い、物質1、物質2及び物質3高含有画分を採取した。分画用樹脂は、塩型強酸性カチオン交換樹脂(オルガノ株式会社販売、商品名XT-1016Na型)を使用し、内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラムに水懸濁状態で充填した。この際、樹脂層長5mのカラム4本を接続して樹脂層全長を約20mになるようにした。カラム内温度を55℃に維持しつつ、原料の糖溶液を5v/v%加え、これに55℃の温水をSV 0.3の流速で流して分画し、物質1、物質2及び物質3高含有画分を採取した。採取された物質1、物質2及び物質3高含有液をさらにオクタデシルシリカゲルを担体とした分取用液体クロマトグラフィー(分取用カラムとしてYMC-Pack R-355-15(株式会社YMC販売)を使用し、溶離液は水を用いた。)にかけ、それぞれ純度97%以上の高含有画分を採取し、真空乾燥、粉末化して、粉末状の物質1、物質2及び物質3の高純度標品を得た。

【0048】

【実験B-2 α-D-オリゴグルコシル α-D-オリゴグルコシドの理化学的性質】実験B-1の方法で調製した物質1、物質2及び物質3の高純度標品を試料と

して、下記の理化学的性質を調べた。

#### (1) 元素分析

##### 物質1

測定値 C=44.3% H=6.2%

理論値 C=43.25% H=6.35%

(分子式: C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>O<sub>21</sub>)

##### 物質2

測定値 C=43.7% H=6.0%

理論値 C=43.48% H=6.32%

(分子式: C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>26</sub>)

##### 物質3

測定値 C=43.8% H=6.1%

理論値 C=43.64% H=6.31%

(分子式: C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>31</sub>)

#### (2) 分子量

物質1 666.6

物質2 828.7

物質3 990.9

#### (3) 紫外線吸収

いずれの試料も特徴ある吸収は示さない。

#### (4) 呈色反応

いずれの試料もアントロン-硫酸反応で緑色を呈し、フェーリング氏液還元反応、ヨウ素反応は陰性。

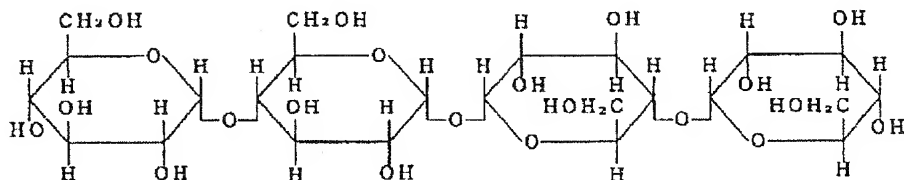
#### (5) 構造

(a) 1N-硫酸で加水分解すると、いずれの試料ともD-グルコースのみを生成する。

(b) グルコアミラーゼの作用により、物質1はグルコース2モルとトレハロース1モルを、物質2はグルコース3モルとトレハロース1モルを、物質3はグルコース4モルとトレハロース1モルを生成した。

(c) 炭素核磁気共鳴分析(<sup>13</sup>C-NMR)により、物質1は、異なる12本の<sup>13</sup>Cシグナルが得られた。本物質は24個の炭素を持っており、12組の2個ずつ等価な炭素原子の存在が分かった。クラウス・ボック(KLAUS BOCK)等が、『アドバンシス・イン・カーボハイドレート・ケミストリー・アンド・バイオケミストリー(Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry)』、第42巻、第193乃至225頁(1984年)で報告している標準物質、α-D-グルコピラノース、α、α'-トレハロース及びマルトオリゴ糖の化学シフトより、各炭素を帰属し、本物質は、O-α-D-グルコピラノシル(1→4)-α-D-グルコピラノシル α-D-マルトシドの構造を有しているものと判断される。また物質2は、異なる19本の<sup>13</sup>Cシグナルが得られた。本物質は炭素原子を30個持っており、7組の2個ずつ等価な炭素原子と1組の5個等価な炭素原子の存在が明らかとなった。物質1の場合と同様にクラウス・ボック等が報告している標準物質の化学シフトより、各炭素を帰属し、本物質は、O-α-D-グ

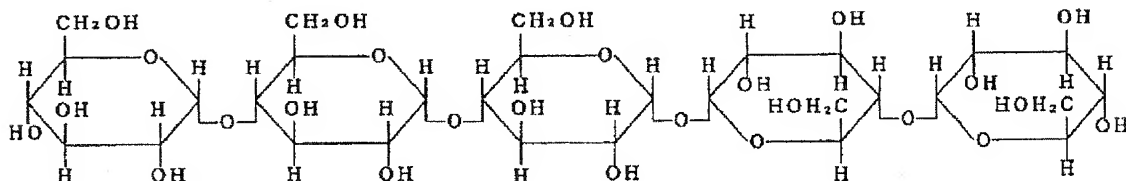
ルコピラノシルー (1→4) - O -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1→4) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー  $\alpha$ -D-マルトシドの構造を有しているものと判断される。また、物質3は異なる16本の $^{13}\text{C}$ シグナルが得られた。本物質は炭素原子を36個持っており、15組の2個ずつ等価な炭素原子と1組の6個等価な炭素原子の存在が明らかとなった。物質1の場合と同様にクラウス・ボック等が報告している標準物質の化学シフトより、各マルトシルマルトシドの構造



【0050】

マルトトリオシルマルトシドの構造

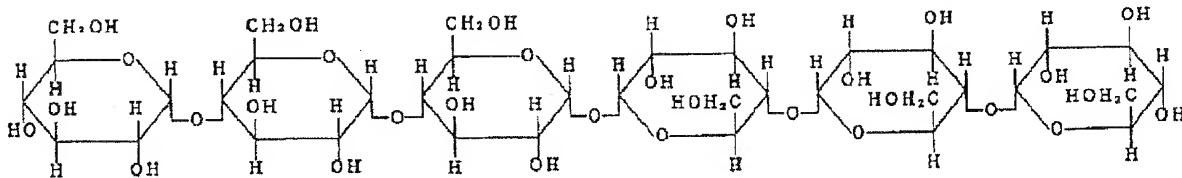
【化2】



【0051】

マルトトリオシルマルトトリオシドの構造

【化3】



【0052】これらの構造から、物質1を $\alpha$ -D-マルトシル  $\alpha$ -D-マルトシド (別名、マルトシルマルトシド)、物質2を $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトシド (別名、マルトトリオシルマルトシド) 及び物質3を $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシド (別名、マルトトリオシルマルトトリオシド) と命名する。以上の結果より、これらの物質はいずれも、分子内にトレハロース構造を有する従来全く知られていない新規非還元性オリゴ糖である。

【0053】

【実験B-3 急性毒性試験】マウスを使用して、実験B-1の方法で調製した高純度マルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドをそれぞれに経口投与して急性毒性テストを行った。その結果、マルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオ

炭素を帰属し、本物質は、O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1→4) - O- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1→4) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー  $\alpha$ -D-マルトトリオシドの構造を有しているものと判断される。以上の結果より、物質1、物質2及び物質3の化学構造は、それぞれ化1、化2及び化3に示す。

【0049】

【化1】

シドは低毒性の物質で、いずれも投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。したがって、正確な値はいえないが、そのLD<sub>50</sub>値は、いずれも50 g/kg以上であった。

【0054】

【実験B-4 結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドの調製と理化学的性質】実験B-1の方法で調製した純度97%以上の $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシド (物質3) を常法にしたがって、脱色、脱塩し、濃度70%に濃縮し、ビーカーに入れ、4℃の冷室に2ヶ月間放置したものから結晶の析出が認められた。本結晶を遠心分離して集め、少量の水で洗浄し、純度99.0%の結晶を得た。

【0055】本結晶の理化学的性質を調べたところ、次の通りであった。

(1) 物質の色

無色の透明な結晶

(2) 溶解度

溶解度は比較的高く、25℃の水100mlに対して約91g溶解する。

(3) 融点

m. p. 215℃

(4) 赤外線吸収スペクトル

結晶粉末1mgと乾燥KBr200mgを混合し、透明なタブレットを作成して、赤外線吸収スペクトルを測定した。結果は図5に示す。

(5) 粉末X線回折

エフ・エイチ・ストドーラ (F. H. Stodola) 等が、『ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of the American Chemical Society)』、第78巻、第2514乃至2518頁(1956年)に報告している方法に準じて、結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドのCuK $\alpha$ 線を使用した粉末X線回折図形を測定した。結果を図6に示した。図6の結果より明らかなように、結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドは、粉末X線回折法における主な回折角(2 $\theta$ )として7.8°、10.0°、13.1°、17.5°及び18.2°を有する。

以上の結果より、この結晶は、新規 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドの結晶である。

【0056】本結晶の製造方法は、 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドの過飽和溶液から結晶を晶出させ、これを採取する方法であればよく、公知の方法、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法などの方法が適宜採用できる。このようにして得られる結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドは、 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドの純度によってその吸湿性が多少変動するが、実質的に非吸湿性であり、流動性であり、粘着、固着の懸念もなく、取扱い容易なので、例えば、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物、更には、化学原料などの各種用途に有利に利用できる。また、結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドは、その純度の違いにより、融点、比旋光度が変化する。このうち融点は、通常、その純度の低下にともなって低下し、融解温度の幅も広くなる。したがって、結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドは、必要性に応じて、その純度を適宜選択して利用すればよい。

【0057】以下、本発明の若干の実施例として、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドの製造方法を実施例Aで、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドの用途を実施例Bで示す。

【0058】

【実施例A-1】実験A-6の方法で調製したトレハロース1重量部及びデキストリン (DE18、松谷化学工業株式会社販売、商品名パインデックス#4) 2重量部を水3.7重量部に加熱溶解し、この溶液を温度60℃、pH5.6にして、バチルス・ステアロサーモフィラス由来のシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)をデキストリンg当たり15単位加えて24時間反応させ、次いで加熱して酵素を失活させた。本溶液を常法にしたがって、活性炭にて脱色、イオン交換樹脂(H型及びOH型)にて脱塩して精製し、濃縮して、濃度75%のシラップを、固形物当たり収率約92%で得た。

【0059】本品は、マルトシルマルトシド、マルトリオシルマルトシド、マルトリオシルマルトトリオシド、マルトテトラオシルマルトトリオシド及びマルトテトラオシルマルトテトラオシドなどの非還元性オリゴ糖を固形物当たり約65%含有しており、低い甘味、適度の粘度、保湿性を有し、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0060】

【実施例A-2】市販のトレハロース(和光純薬製)1重量部及び $\alpha$ -シクロデキストリン1.5重量部を水4重量部に加熱溶解し、温度65℃、pH5.6にして、実施例A-1の場合と同じシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを $\alpha$ -シクロデキストリンg当たり10単位加えて24時間反応させ、次いで酵素を加熱失活させた。この溶液を温度55℃、pH5.6にして、 $\beta$ -アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社販売#1500)を固形物g当たり20単位加えて16時間反応させ、次いで酵素を加熱失活させた。本溶液を実施例A-1と同様に精製、濃縮して、濃度75%のシラップを、固形物当たり収率約93%で得た。

【0061】本品は、マルトシルマルトシド、マルトリオシルマルトシド及びマルトリオシルマルトトリオシドを固形物当たりそれぞれ約15%、約15%及び約4%含有しており、実施例A-1の場合と同様に、低い甘味、適度の粘度、保湿性を有し、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0062】

【実施例A-3】濃度20%澱粉乳に $\alpha$ -アミラーゼ(ノボ・ノルディスク・インダストリー社販売、商品名ターマミール60L)を澱粉固形物当たり0.015%加え、95乃至100℃に加熱して液化し、酵素を加熱失活させてDE3の液化液を得た。本液に固形物として澱粉質と等重量の実験A-6の方法で調製したトレハロースを溶解し、温度55℃、pH5.3にして、イソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)を澱粉g当たり50単位及び実施例A-1の場合と同じシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを澱粉g当たり10単位加えて40時間反応させ、次いで酵素

を加熱失活させた。この溶液に水を加えて濃度約25%に希釈した後、温度55℃、pH5.3に維持して、 $\beta$ -アミラーゼを固形物g当たり20単位加えて16時間反応させ、次いで酵素を加熱失活させた。本溶液を実施例A-1と同様に精製、濃縮し、常法にしたがい噴霧乾燥して、水分約2%未満の粉末を収率約90%で得た。

【0063】本品は、マルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドを固形物当たりそれぞれ約20%、約20%及び約6%含有しており、実施例A-1の場合と同様に、低い甘味、適度の粘度、保湿性を有し、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0064】

【実施例A-4】実施例A-2の方法で調製したマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有溶液を原料糖液とし、これを濃縮して濃度約45%にした。本液のマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含量を高めるため、分画用樹脂として、塩型強酸性カチオン交換樹脂（ダウケミカル社販売、商品名ダウエックス50W-X4、Ca型）を用いた以外は、実験B-1の方法にしたがってカラムクロマトグラフィーを行い、マルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド高含有画分を採取し次いで、本画分を実施例A-1と同様に精製、濃縮して濃度65%のシラップを固形物当たり収率約45%で得た。

【0065】本品は、マルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドをそれぞれ固形物当たり約35%、約35%及び約10%含有しており、実施例A-1の場合と同様に低い甘味、適度の粘度、保湿性を有し、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0066】

【実施例A-5】実施例A-3の方法で調製したマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有溶液を原料糖液とし、これを濃縮して濃度約50%にした。本液を実験B-1の方法にしたがってカラムクロマトグラフィーを行い、マルトシルマルトシド高含有画分、マルトトリオシルマルトシド高含有画分及びマルトトリオシルマルトトリオシド高含有画分のそれぞれを採取し次いで、これら画分を実施例A-1と同様に精製、濃縮して濃度65%のシラップを、それぞれ固形物当たり収率約15%、約15%及び約4%で得た。

【0067】これらは、高純度マルトシルマルトシド、高純度マルトトリオシルマルトシド又は高純度マルトトリオシルマルトトリオシドを、それぞれ固形物当たり約97%含有しており、実施例A-1の場合と同様に低い甘味、適度の粘度、保湿性を有し、飲食物、化粧品、医

薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0068】

【実施例A-6】実施例A-5の方法で得た高純度マルトトリオシルマルトトリオシドを濃度約85%に濃縮し、この濃縮液を助晶缶にとり、結晶マルトトリオシルマルトトリオシドを種晶として2%加えて徐冷しながら攪拌して助晶し、次いでバットに取り出し、室温で2日間放置して晶出、熟成させ、得られたブロックを切削機で粉碎し、乾燥、分級して、結晶マルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末を得た。

【0069】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱い容易である。また、溶解性良好で、低い甘味、適度の粘度、保湿性、安定性を有し、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0070】

【実施例A-7】実験A-6の方法で調製した末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を含む糖混合物20%溶液にシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼを固形物g当たり10単位加えて24時間反応させ、次いで酵素を加熱失活させた。この溶液を温度55℃、pH5.3に維持して、 $\beta$ -アミラーゼをデキストリンg当たり20単位加えて16時間反応させ、次いで酵素を加熱失活させた。本溶液を実施例A-1と同様に精製、濃縮して濃度75%のシラップを、固形物当たり収率約92%で得た。

【0071】本品は、マルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドを固形物当たりそれぞれ約25%、約25%及び約8%含有しており、実施例A-1の場合と同様に、低い甘味、適度の粘度、保湿性を有し、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0072】

【実施例A-8】実施例A-4の方法で調製したマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド高含有シラップを、常法に従い噴霧乾燥し、水分約1%の粉末を、収率約90%で得た。

【0073】本品は、実施例A-1の場合と同様に、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0074】

【実施例A-9】実施例A-5の方法で調製した高純度マルトシルマルトシドシラップを60℃で24時間真空乾燥を行った。得られた乾燥物を粉碎機にて粉碎し、水分約0.5%の粉末を収率約93%で得た。

【0075】本品は、実施例A-1の場合と同様に、飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの各種組成物に有利に利用できる。

【0076】

【実施例B-1 甘味料】 実施例A-6の方法で得

た結晶マルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末1重量部に、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド（東洋精糖株式会社販売、商品名 $\alpha$ Gスイート）0.05重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて、顆粒状甘味料を得た。

【0077】本品は、溶解性良好で甘味の質が優れ、蔗糖の約2倍の甘味度を有し、甘味度当たりカロリーは、蔗糖の約1/2に低下している。本甘味料は、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付けにも好適である。

【0078】

【実施例B-2 ハードキャンデー】55%蔗糖溶液100重量部に実施例A-1の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドなどの非還元性オリゴ糖含有シラップ30重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分2%未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸1重量部及び適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法にしたがって成形し、製品を得た。

【0079】本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出も起こらない高品質のハードキャンデーである。

【0080】

【実施例B-3 いちごジャム】生いちご150重量部、蔗糖60重量部、マルトース20重量部、実施例A-2の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有シラップ40重量部、ペクチン5重量部及びクエン酸1重量部をなべて煮詰め、ビン詰して製品を得た。

【0081】本品は、風味、色調とも良好なジャムである。

【0082】

【実施例B-4 乳酸飲料】脱脂乳10重量部を80℃で20分間加熱殺菌した後、40℃に冷却し、これにスターター0.3重量部を加えて約37℃で10時間醗酵させた。次いで、これをホモゲナイズした後、実施例A-8の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末4重量部、蔗糖1重量部及び異性化糖シラップ2重量部を加えて70℃に保って殺菌した。これを冷却し、適量の香料を加え、ビン詰して製品を得た。

【0083】本品は、風味、甘味が酸味とよく調和した高品質の乳酸飲料である。

【0084】

【実施例B-5 加糖練乳】原乳100重量部に実施例A-1の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシドなどの非還元性オリゴ糖含有シラップ3重量部及び蔗

糖1重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度約70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。

【0085】本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0086】

【実施例B-6 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末33重量部に対し、実施例A-9の方法で得た高純度マルトシルマルトシド粉末50重量部、蔗糖10重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、L-アスコルビン酸0.1重量部、クエン酸ソーダ0.1重量部、プルラン0.5重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに、実施例A-4の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド高含有シラップをバインダーとしてスプレーし、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。

【0087】本品は、果汁含有率約30%の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、吸湿固結も起こさず長期に安定であった。

【0088】

【実施例B-7 チョコレート】カカオペースト40重量部、カカオバター10重量部、蔗糖30重量部、実施例A-9の方法で得た高純度マルトシルマルトシド粉末20重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて50℃で2昼夜練り上げる。この間に、レシチン0.5重量部を加え充分に混和分散させた。次いで、温度調節機で31℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、振動機でアワ抜きを行い、10℃の冷却トンネルを20分間くぐらせて固化させた。これを型抜きして包装し製品を得た。

【0089】本品は、吸湿性がなく、色、光沢共によく、内部組織も良好で、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。

【0090】

【実施例B-8 チューインガム】ガムベース3重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖4重量部及び実施例A-8の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末3重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法にしたがって、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。

【0091】本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。

【0092】

【実施例B-9 カスタードクリーム】コーンスターチ100重量部、実施例A-3の方法で得たマルトシルマ



ルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末100重量部、マルトース80重量部、蔗糖20重量部及び食塩1重量部を充分に混合し、鶏卵280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1,000重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。

【0093】本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【0094】

【実施例B-10 ういろうの素】米粉90重量部に、コーンスターチ20重量部、実施例A-9の方法で得た高純度マルトシルマルトシド粉末120重量部、プルラン4重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて60分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。

【0095】本品は、照り、口当たりも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちもよい。

【0096】

【実施例B-11 乳液】ポリオキシエチレンベヘニルエーテル0.5重量部、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール1重量部、親油型モノステアリン酸グリセリン1重量部、ベヘニルアルコール0.5重量部、アボカド油1重量部、実施例A-7の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有シラップ3.5重量部、 $\alpha$ -グリコシルルチン1重量部、ビタミンE及び防腐剤の適量を、常法にしたがって加熱溶解し、これに1,3-ブチレングリコール5重量部、カルボキシビニルポリマー0.1重量部及び精製水85.3重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ、乳化し、乳液を製造した。

【0097】本品は、保湿性ある乳液で、日焼け止め、色白剤などとして有利に利用できる。

【0098】

【実施例B-12 スキンクリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、 $\alpha$ -グリコシルルチン2重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部、実施例A-9の方法で得た高純度マルトシルマルトシド粉末4重量部及び防腐剤の適量を、常法にしたがって加熱溶解し、これに1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけて乳化し、更に、香料の適量を加えて攪拌混合し、クリームを製造した。

【0099】本品は、伸びの良いクリームで、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に使用できる。

【0100】

【実施例B-13 練歯磨】第二リン酸カルシウム45重量部、ラウリル硫酸ナトリウム1.5重量部、グリセリン25重量部、ポリオキシエチレンソルビタンラウレート0.5重量部、実施例A-4の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド高含有シラップ15重量部、サッカリン0.02重量部及び防腐剤0.05重量部を水13重量部と混合して練歯磨を得た。

【0101】本品は、光沢、洗浄力も良好で、練歯磨として好適である。

【0102】

【実施例B-14 経管栄養剤】実施例A-8の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末20重量部、グリシン1.1重量部、グルタミン酸ナトリウム1重量部、乳酸カルシウム0.4重量部、炭酸マグネシウム0.1重量部、チアミン0.01重量部及びリボフラビン0.01重量部からなる配合物を調製する。この配合物24gずつをラミネートアルミ製小包に充填し、ヒートシールして製品を得た。

【0103】本品は、1袋分を約33乃至500mlの水に溶解して栄養補給液とし、経管方法により、鼻腔、胃腸などへ投与して使用する。

【0104】本品は、ヒトのみならず、家畜などへの非経口的栄養補給液としても有利に利用できる。

【0105】

【実施例B-15 経管栄養剤】実施例A-6の方法で得た結晶マルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末580重量部、乾燥卵黄190重量部、脱脂粉乳209重量部、塩化ナトリウム4.4重量部、塩化カリウム1.85重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部及びニコチン酸アミド0.04重量部からなる配合物を調製する。この配合物25gずつを、ラミネートアルミ製小包に充填し、ヒートシールして製品を得た。

【0106】本品は、1袋分を約150乃至300mlの水に溶解して、栄養補給液とし、経管方法により鼻腔、食道、胃などへ投与して使用する。

【0107】

【実施例B-16 インターフェロン液剤】ヒト天然型インターフェロン $\gamma$ 標品(株式会社林原生物学研究所製造、コスモ・バイオ株式会社販売)を、常法にしたがって、固定化抗ヒトインターフェロン $\gamma$ 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロン $\gamma$ を吸着させ、安定剤である牛血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、ヒト天然型インターフェロン $\gamma$ を実施例A-5の方法で得た高純度マルトシルマルトシドシラップを固形物として7%含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過

し、無菌的にバイアルビンに充填して、ml 当たりヒト天然型インターフェロナー $\gamma$ を $10^5$ 単位含有する液剤を得た。

【0108】本品は、1日当たり、大人1乃至20ml 程度が経口的又は非経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。本品は、マルトシルマルトシドが安定剤として作用し、4℃又は25℃で20日間放置しても、その活性をよく維持している。

【0109】

【実施例B-17 ツモア・ネクロシス・ファクター液剤】ヒト天然型ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 標品（株式会社林原生物化学研究所製造、コスモ・バイオ株式会社販売）を、常法にしたがって、固定化抗ヒトツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ を吸着させ、安定剤である牛血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、ヒト天然型ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ を実施例A-5の方法で得た高純度マルトトリオシルマルトシドシラップを固形物として10%含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過し、無菌的にバイアルビンに充填して、ml 当たりヒト天然型ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ を $10^4$ 単位含有する液剤を得た。

【0110】本品は、1日当たり、大人1乃至20ml 程度が経口的又は非経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。本品は、マルトトリオシルマルトシドが安定剤として作用し、4℃又は25℃で20日間放置しても、その活性をよく維持している。

【0111】

【実施例 B-18 インターフェロナー $\alpha$ 錠剤】ヒト天然型インターフェロナー $\alpha$ 標品（株式会社林原生物化学研究所製造、コスモ・バイオ株式会社販売）を、常法にしたがって、固定化抗ヒトインターフェロナー $\alpha$ 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロナー $\alpha$ を吸着させ、安定剤である牛血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いでpHを変化させて、ヒト天然型インターフェロナー $\alpha$ を実験B-1の方法で得た高純度マルトトリオシルマルトシド粉末を5%含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過し、約20倍量の無水結晶マルトース粉末（株式会社林原商事販売、商品名ファイントースT）に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1錠（約200mg）当たりヒト天然型インターフェロナー $\alpha$ を約150単位含有する錠剤を得た。

【0112】本品は、舌下錠などとして、1日当たり、大人1乃至10錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患

者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、マルトトリオシルマルトシドと共にマルトースが安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

【0113】

【実施例B-19 肥料杭】配合肥料（N=14%、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>=8%、K<sub>2</sub>O=12%）、ブルラン、実施例A-3の方法で得たマルトシルマルトシド、マルトトリオシルマルトシド及びマルトトリオシルマルトトリオシド含有粉末、硫酸カルシウム及び水の割合を重量でそれぞれ70、5、5、15及び5として充分混合した後、押出機（L/D=20、圧縮比=1.8、ダイスの口径=30mm）で80℃に加熱して肥料杭を製造した。

【0114】本品は、肥料用容器が不要で取扱い容易であり、全層施肥に適した強度を有し、更に配合割合を変えることにより肥料成分の溶出速度を調節できる。必要ならば、この肥料杭に植物ホルモン、農業用薬剤及び土壌改良剤等の混合も容易である。

【0115】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドは非還元性オリゴ糖で、極めて安定であり、水に溶解し易い物質であり、適度な粘性を有し、良質で低甘味を有している。また、 $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドは、化学的に安定であり、褐変反応を起し易いアミノ酸、オリゴペプチド、更には、有効成分、活性の失われ易い生理活性物質などを安定化し得る性質を有している。加えて、浸透圧調節性、賦活性、照り付与性、保湿性、他糖の晶出防止、難醗酵性、澱粉の老化防止性などの性質を具備している。これら諸性質は、飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物の製造に有利に利用できる。したがって、関係業界に与える影響はきわめて大きい。

【0116】したがって、本発明の $\alpha$ -D-オリゴグルコシル  $\alpha$ -D-オリゴグルコシドを含む非還元性オリゴ糖とその製造方法並びに用途の確立は、飲食物、化粧品、医薬品分野における産業的意義が極めて大きい。

【図面の簡単な説明】

【図1】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図3】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

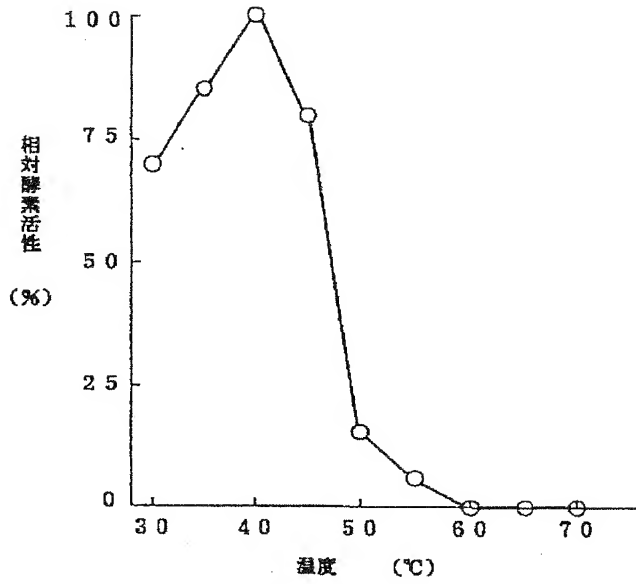
【図4】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素のpH安定性を示す図である。

【図5】結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マルトトリオシドの赤外線吸収スペクトルを示す図である。

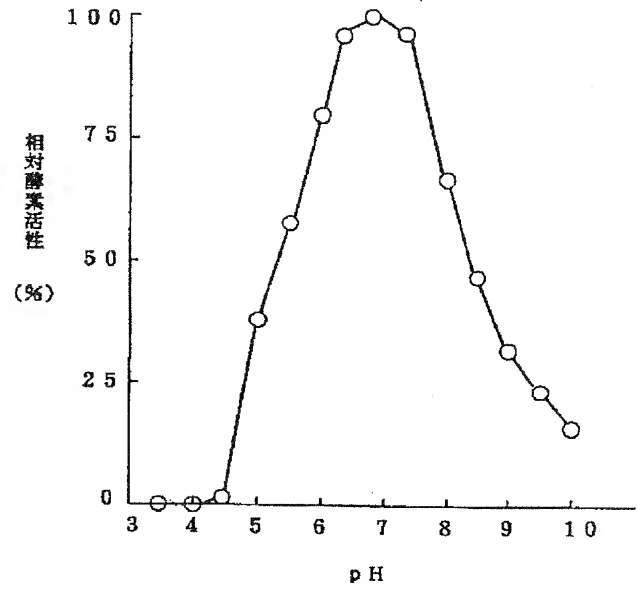
【図6】 結晶 $\alpha$ -D-マルトトリオシル  $\alpha$ -D-マル

トトリオシドの粉末X線回折図形を示す図である。

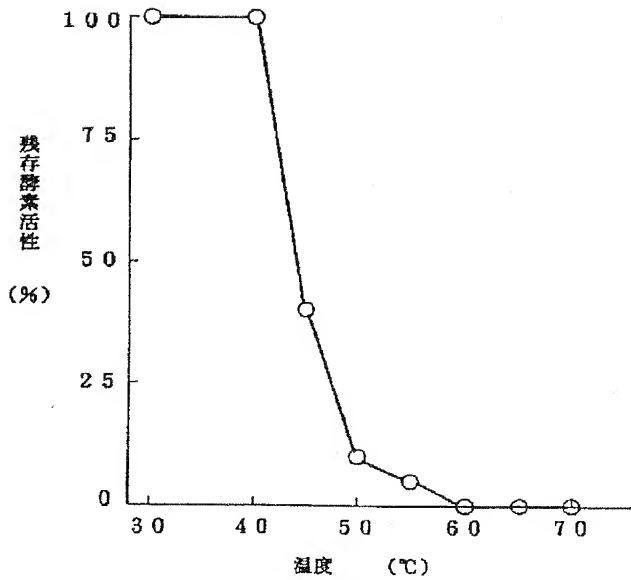
【図1】



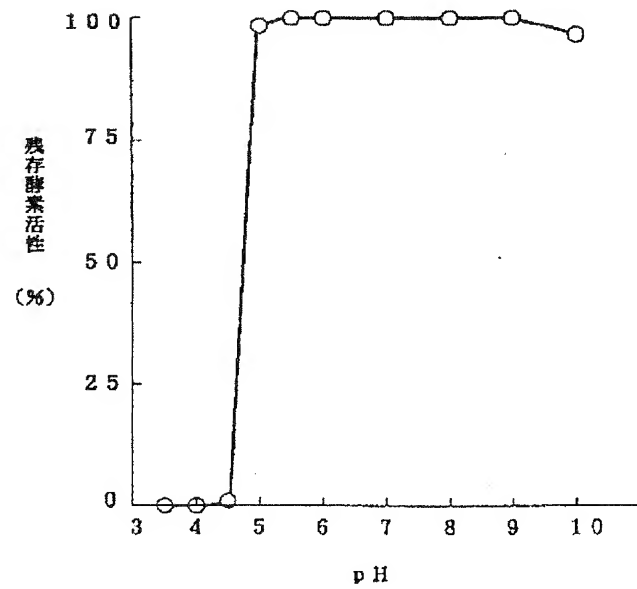
【図2】



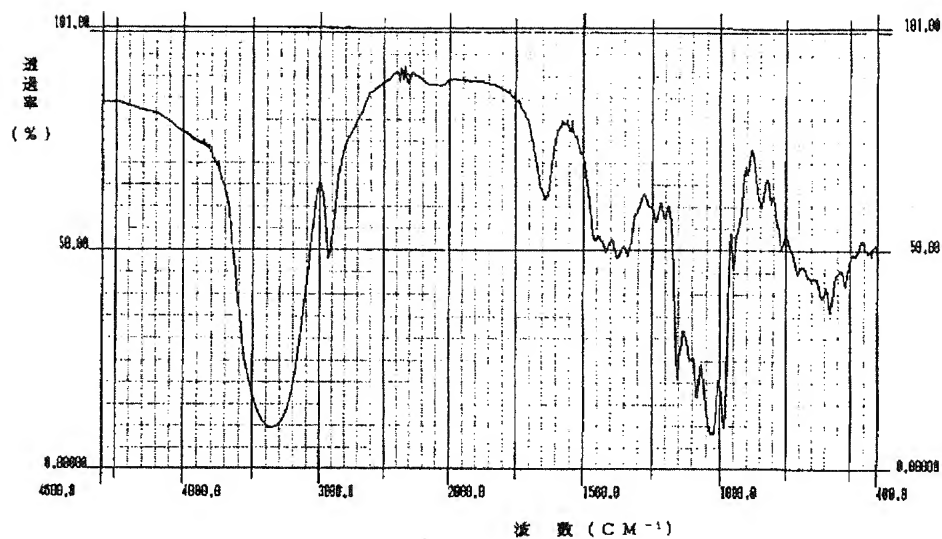
【図3】



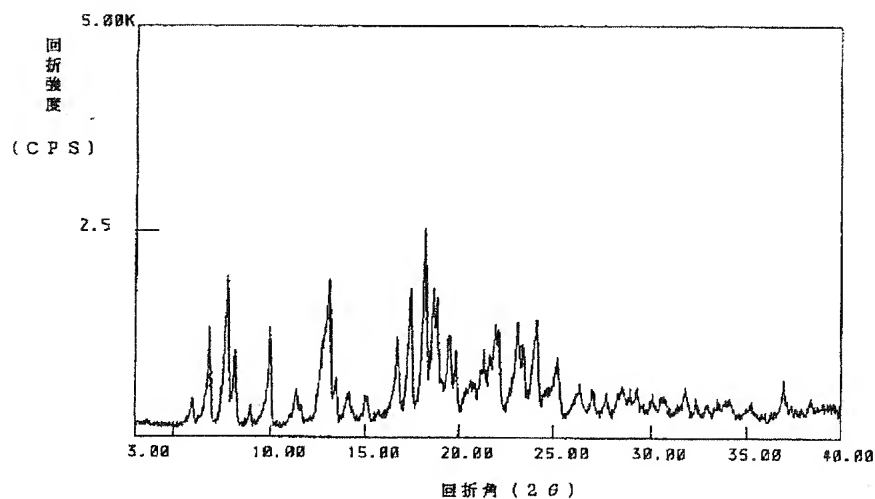
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

31/715

C08B 37/00

C12P 19/18

C13K 13/00

識別記号

F I

31/715

C08B 37/00

C12P 19/18

C13K 13/00

G

(56) 参考文献

特開 平5-70472 (J P, A)

特公 昭54-37211 (J P, B1)

米国特許4359458 (U S, A)

国際公開92/3565 (W O, A1)

(58) 調査した分野(Int. Cl. <sup>7</sup>, D B 名)

C07H 3/06

C08B 37/00

C12P 19/18

A23L 1/236  
A61K 7/00 - 7/50  
A61K 31/702 715  
C13K 13/00  
CA (STN)  
CAOLD (STN)  
REGISTRY (STN)